

小金蝠蛾幼虫血细胞的种类、形态及细胞免疫功能

倪若尧^{1,2}, 孟 茜², 张 寰², 张继红^{2,*}, 秦启联^{2,*}

(1. 河北大学生命科学学院, 河北保定 071002;

2. 中国科学院动物研究所, 农业虫害鼠害综合治理研究国家重点实验室, 北京 100101)

摘要:【目的】本研究旨在鉴定小金蝠蛾 *Thitarodes xiaojinensis* 幼虫血细胞类型, 统计各类血细胞所占比例并检测其细胞免疫能力。【方法】利用光学相差显微镜观察小金蝠蛾 7 龄幼虫血细胞, 并根据鳞翅目昆虫血细胞特有形态对小金蝠蛾幼虫血细胞进行鉴定; 利用 96 孔板对小金蝠蛾各类血细胞进行计数并计算各类血细胞所占的比例; 利用酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 以及 Congo Red 染色的 DEAE-Sephadex A-25 凝胶珠刺激小金蝠蛾 7 龄幼虫, 检验其细胞免疫反应。【结果】小金蝠蛾幼虫血细胞由粒细胞、浆细胞、珠血细胞和类绛色细胞组成, 所占比例分别为 62.5%, 26.6%, 10.1% 和 0.8%, 未发现典型的原血细胞。酿酒酵母刺激结果显示, 小金蝠蛾幼虫血细胞可以发生吞噬以及结节反应。Congo Red 染色的 DEAE-Sephadex A-25 凝胶珠刺激结果显示, 小金蝠蛾幼虫血细胞可以发生包囊反应。【结论】小金蝠蛾幼虫血细胞组成及其形态与其他鳞翅目昆虫一致, 其中粒细胞所占的比例最高。小金蝠蛾幼虫血细胞对酿酒酵母刺激敏感, 可发生吞噬和结节反应, 对 Congo Red 染色的 DEAE-Sephadex A-25 凝胶珠刺激敏感, 可发生包囊反应。小金蝠蛾细胞免疫功能完善。

关键词: 小金蝠蛾; 血细胞; 细胞免疫; 吞噬; 结节; 包囊

中图分类号: Q965.8 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2018)04-0432-07

Types, morphology and cellular immune functions of hemocytes in larvae of *Thitarodes xiaojinensis* (Lepidoptera: Hepialidae)

NI Ru-Yao^{1,2}, MENG Qian², ZHANG Huan², ZHANG Ji-Hong^{2,*}, QIN Qi-Lian^{2,*} (1. College of Life Sciences, Hebei University, Baoding, Hebei 071002, China; 2. State Key Laboratory of Integrated Pest Management, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: 【Aim】 This study aims to identify the types of hemocytes, to determine their proportions in the hemolymph of larvae of the ghost moth, *Thitarodes xiaojinensis*, and to examine the cellular immune functions of hemocytes. 【Methods】 The morphology of hemocytes of *T. xiaojinensis* larvae was observed under optical phase contrast microscopy and compared with the characteristic morphology of various hemocytes of lepidopteran insects. The cellular immune responses of hemocytes in the 7th instar larvae of *T. xiaojinensis* were examined after stimulating them with *Saccharomyces cerevisiae* and Congo Red stained DEAE-Sephadex A-25. 【Results】 The hemocytes of *T. xiaojinensis* larvae are composed of granular hemocytes, plasmotocytes, spherule cells and oenocytoids, accounting for 62.5%, 26.6%, 10.1% and 0.8%, respectively. The typical prohemocytes were not observed. The results of stimulation with *S. cerevisiae* showed that the hemocytes of *T. xiaojinensis* larvae could react with phagocytosis and nodulation. The results of stimulation with Congo Red stained DEAE-Sephadex A-25 showed that the

基金项目: 国家自然科学基金项目(31772525, 31671404)

作者简介: 倪若尧, 男, 1993 年 8 月生, 江苏徐州人, 硕士研究生, 研究方向为昆虫免疫学, E-mail: 872446291@qq.com

* 通讯作者 Corresponding authors, E-mail: zhangjh@ioz.ac.cn; qinqi@ioz.ac.cn

收稿日期 Received: 2018-01-25; 接受日期 Accepted: 2018-02-13

hemocytes in *T. xiaojinensis* larvae had the ability of encapsulation. 【Conclusion】 The composition and morphology of hemocytes of *T. xiaojinensis* larvae are the same as those of other lepidopteran insects, and the granular hemocytes have the highest proportion. Hemocytes in *T. xiaojinensis* larvae are sensitive to the stimulation of *S. cerevisiae* and Congo Red stained DEAE-Sephadex A-25. The former causes phagocytosis and nodulation, while the latter causes encapsulation. The function of cellular immunity in *T. xiaojinensis* is typical.

Key words: *Thitarodes xiaojinensis*; hemocytes; cellular immunity; phagocytosis; nodulation; encapsulation

昆虫免疫系统被分为体液免疫和细胞免疫。体液免疫通过产生抗菌肽 (Lowenberger, 2001)、活性氧与活性氮 (Bogdan *et al.*, 2000), 并通过复杂的酚氧化酶原级联系统, 在血淋巴中进行黑化反应 (Gillespie *et al.*, 1997; Cerenius and Soderhall, 2004), 从而发挥防御外源物入侵的功能。细胞免疫包括由昆虫血细胞进行的吞噬 (phagocytosis)、结节 (nodulation) 以及包囊 (encapsulation) 反应 (Strand and Pech, 1995; Schmidt *et al.*, 2001; Kamaladevi *et al.*, 2017)。鳞翅目昆虫的血细胞在形态学上可分为浆细胞 (plasmotocytes, PL)、粒细胞 (granulocytes, GR)、珠血细胞 (spherule cells, Sph)、类绦色细胞 (oenocytoids, OE) 以及原血细胞 (prohemocytes) (Butt and Shields, 1996)。在鳞翅目昆虫中, 浆细胞与粒细胞占有血细胞 50% 以上, 在有外源物刺激的情况下浆细胞与粒细胞能够发生粘附作用, 是昆虫细胞免疫反应的主力 (Lackie, 1988; Strand and Pech, 1995; Blanco *et al.*, 2017)。珠血细胞被认为在表皮物质运输方面起作用 (Sass *et al.*, 1994), 类绦色细胞中富含酚氧化酶前体, 被认为在黑化反应中起作用 (Ashida and Dohke, 1980; Iwama and Ashida, 1986; Dubovskiy *et al.*, 2016)。原血细胞具有干细胞功能, 可以分化成一种或几种上述类型的血细胞 (Gardiner and Strand, 2000; Lanot *et al.*, 2001; Majumder *et al.*, 2017)。

鳞翅目 (Lepidoptera) 蝙蝠蛾科 (Hepialidae) 的部分昆虫是冬虫夏草菌 *Ophiocordyceps sinensis* 的宿主昆虫, 二者形成的虫菌复合体即为冬虫夏草。冬虫夏草是名贵的中药材, 具有抗肿瘤、抗过敏以及免疫调节等功能 (Ng and Wang, 2005; Zhou *et al.*, 2009; Hu *et al.*, 2013), 在经济和药用价值上具有重要地位。目前对于冬虫夏草菌寄主蝙蝠蛾的血细胞, 特别是细胞免疫方面的研究仍为空白, 研究蝙蝠蛾血细胞及其细胞免疫, 不仅可以为冬虫夏草的人工培植提供理论指导, 也有助于昆虫细胞免疫学的

发展。

本研究以小金蝠蛾 *Thitarodes xiaojinensis* 7 龄幼虫为研究对象, 通过形态学观察来鉴定小金蝠蛾幼虫血细胞类型, 并对不同类型的血细胞进行计数, 计算不同血细胞在小金蝠蛾血淋巴中的所占比例。同时利用不同外源物的刺激, 探究小金蝠蛾细胞免疫的功能。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

小金蝠蛾原始种群来源于四川省阿坝藏族羌族自治州小金县, 已在中国科学院动物研究所农业虫害鼠害综合治理研究国家重点实验室昆虫病毒学研究室实验室内饲养 3 代, 饲养温度 $13 \pm 2^\circ\text{C}$, 相对湿度 60% ~ 80%, 幼虫期与蛹期于黑暗条件下饲养, 成虫期于 14L: 10D 光周期条件下饲养。

1.2 实验用菌株

酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 由中国科学院动物研究所农业虫害鼠害综合治理研究国家重点实验室昆虫病毒学研究室提供。

1.3 主要试剂及器材

Ringer's 生理盐水配制: NaCl 8.05 g, KCl 0.42 g, CaCl_2 0.18 g, 双蒸水定容至 1 L, HCl 与 NaOH 调至 pH 7.4。过饱和 PTU-Ringer's 生理盐水配制: 将过量的苯基硫脲 (PTU) 加入 Ringer's (pH 7.4) 中, 震荡、溶解后备用。2.5% 戊二醛固定液购自 Leagene 公司。1% Congo Red 染液配制: Congo Red 粉剂 10 mg 用双蒸水定容至 10 mL。DEAE-Sephadex A-25 凝胶珠 (干粉型) 购自 Sigma 公司。96 孔细胞培养板购自 NEST 公司。

1.4 小金蝠蛾幼虫血细胞常规涂片制作与观察

取小金蝠蛾 7 龄幼虫血淋巴 2 μL 与 1 μL 过饱和 PTU-Ringer's 生理盐水混匀滴于载玻片上, 用盖玻片缓慢覆盖载玻片上血淋巴液滴, 用吸水纸吸走

多余溢出的液体,于正置光学相差显微镜(Leica, 德国)下观察各类血细胞形态并鉴定。

1.5 小金蝠蛾幼虫各类血细胞所占比例统计

分别向 96 孔细胞培养板的 6 个孔板中注入 Ringer's 生理盐水(每孔 170 μL)以及过饱和 PTU-Ringer's 生理盐水上清液(每孔 20 μL),吹打混匀。取 6 头健康小金蝠蛾 7 龄幼虫,各取 10 μL 血淋巴分别注入上述 6 个孔板中,轻轻吹打混匀,置 13 $^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱(Memmert, 德国),使血细胞沉降孵育 1 h。对 6 个孔板中各类血细胞进行随机视野计数,并计算各类血细胞所占百分比。

1.6 小金蝠蛾幼虫血细胞的细胞免疫吞噬功能检测

分别向 96 孔细胞培养板的 6 个孔板中注入 Ringer's 生理盐水(每孔 160 μL)、过饱和 PTU-Ringer's 生理盐水上清液(每孔 20 μL)以及酿酒酵母菌液(每孔 10 μL , Ringer's 生理盐水菌悬液 1.0×10^4 个/mL)。取 6 头健康小金蝠蛾 7 龄幼虫,各取 10 μL 血淋巴分别注入上述 6 个孔板中,轻轻吹打混匀,置 13 $^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱(Memmert, 德国),共孵育 2 h。于倒置光学相差显微镜(Leica, 德国)下观察小金蝠蛾幼虫血细胞吞噬酵母细胞的过程。

1.7 小金蝠蛾幼虫血细胞的细胞免疫形成结节功能检测

分别向 6 头健康 7 龄小金蝠蛾幼虫微量注射 5 μL 酿酒酵母菌液(Ringer's 生理盐水菌悬液 1.0×10^8 个/mL)。注射酿酒酵母菌液 1 h 后取注菌幼虫血淋巴,12 h 后解剖注菌幼虫取得脂肪体,于正置光学相差显微镜下观察结节形成情况。

1.8 小金蝠蛾幼虫血细胞的细胞免疫形成包囊功能检测

取 DEAE-Sephadex A-25 凝胶珠(干粉型)20 mg 加入 2 mL 1% Congo Red 染液中染色 5 min,用蒸馏水洗去多余染液,离心(2 000 g 5 min)弃上清,向沉淀 Congo Red-DEAE-Sephadex A-25 凝胶珠加入 Ringer's 生理盐水 1 mL,制成 Congo Red-DEAE-Sephadex A-25 凝胶珠 Ringer's 生理盐水悬液,4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。分别向 6 头健康的 7 龄小金蝠蛾幼虫注射 30 ~ 50 粒 Congo Red-DEAE-Sephadex A-25 凝胶珠,1 h 以及 12 h 后解剖被注幼虫(各解剖 3 头),取出 Congo Red-DEAE-Sephadex A-25 凝胶珠,于倒置光学相差显微镜下观察小金蝠蛾幼虫血细胞包囊形成情况。

2 结果

2.1 小金蝠蛾幼虫血细胞形态

显微观察小金蝠蛾幼虫血细胞表明,其血细胞类型与其他鳞翅目昆虫一致(图 1: A),在形态学上可分为粒细胞、浆细胞、类绦色细胞和珠血细胞。其中粒细胞(图 1: B)为圆形或卵圆形,直径约为 10 ~ 12 μm ,贴壁后一段时间可延展成片状伪足和丝状伪足,但细胞质仍为圆形或卵圆形,细胞质内富含黑色颗粒内含物;浆细胞(图 1: C)未延展时为圆形、卵圆形或梭形,直径约为 10 ~ 12 μm ,贴壁后一段时间可延展成片状伪足和丝状伪足,细胞质往往形变为梭形或不规则形状,延展后长距为 15 ~ 20 μm ,宽距为 6 ~ 12 μm ,细胞质内也有黑色颗粒内含物;类绦色细胞(图 1: D)为圆形或卵圆形,有时也有不规则形状,直径约为 20 ~ 30 μm ,不可延展,贴壁能力差,细胞质混沌均一,细胞核染色质一般成浓缩状态,此细胞极易破裂溶胞,并向血淋巴中释放内含物;珠血细胞(图 1: E)往往被内涵物小球填充成不规则形状,但大体呈卵圆形,直径约为 12 ~ 25 μm ,不可延展,贴壁能力差,除了内含物小球外,几乎看不到细胞质。体外培养时,细胞膜会破裂释放出内含物小球。血细胞在孔板中孵育初期(图 1: A),粒细胞与浆细胞的形态难以区别,需要孵育 1 h 以上,待两类细胞延展后,方可容易识别与鉴定。在小金蝠蛾血淋巴中并未发现典型的原血细胞。

2.2 小金蝠蛾幼虫各类血细胞所占比例

小金蝠蛾 7 龄幼虫各类血细胞在总血细胞中所占比例分别为粒细胞 62.5% $\pm$ 5.65%,浆细胞 26.6% $\pm$ 3.39%,珠血细胞 10.1% $\pm$ 2.56%,类绦色细胞 0.8% $\pm$ 0.75%(图 2)。粒细胞所占比例最高,达 62.5%,粒细胞和浆细胞所占比例高达 89%,表明这两种血细胞在小金蝠蛾血淋巴的细胞免疫功能中发挥主要作用,同时也暗示细胞免疫在小金蝠蛾免疫系统中可能发挥重要作用。

2.3 小金蝠蛾幼虫血细胞的细胞免疫体外吞噬功能

将小金蝠蛾幼虫血淋巴、饱和 PTU-Ringer's 生理盐水与酿酒酵母悬液一起加入 96 孔细胞培养板中,轻轻吹打混匀后于倒置光学相差显微镜下观察,并进行延时拍照(拍照间隔时间:2 min),体外跟踪观察血细胞对外源物(酿酒酵母)的细胞免疫反应。结果发现,小金蝠蛾幼虫血细胞对酿酒酵母敏感,可

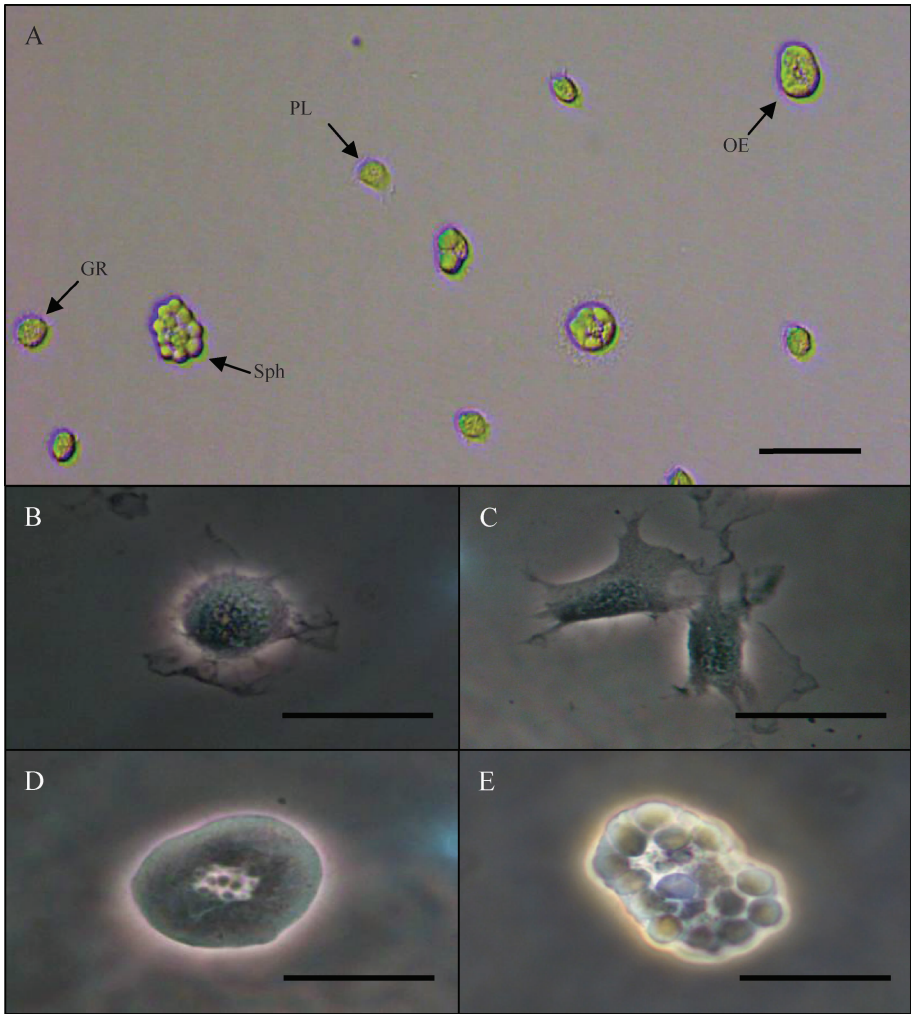


图 1 小金蝠蛾 7 龄幼虫血细胞形态

Fig. 1 Morphology of hemocytes of the 7th instar larvae of *Thitarodes xiaojinensis*
A: 小金蝠蛾幼虫血细胞孔板孵育初期,可见粒细胞 (GR)、浆细胞 (PL)、类绦色细胞 (OE) 和珠血细胞 (Sph)。不同种类血细胞已用黑色箭头标出。At the initial incubation stage of hemocytes of *T. xiaojinensis* larvae in well plates, granulocytes (GR), plasmotocytes (PL), oenocytoids (OE), and spherule cells (Sph) can be observed. Different types of hemocytes are pointed out by black arrows. 标尺 Scale bar = 40 μm . B: 粒细胞 Granulocytes; C: 浆细胞 Plasmotocytes; D: 类绦色细胞 Oenocytoids; E: 珠血细胞 Spherule cells. B - E 图标尺 Scale bars in Figs. B - E = 20 μm .

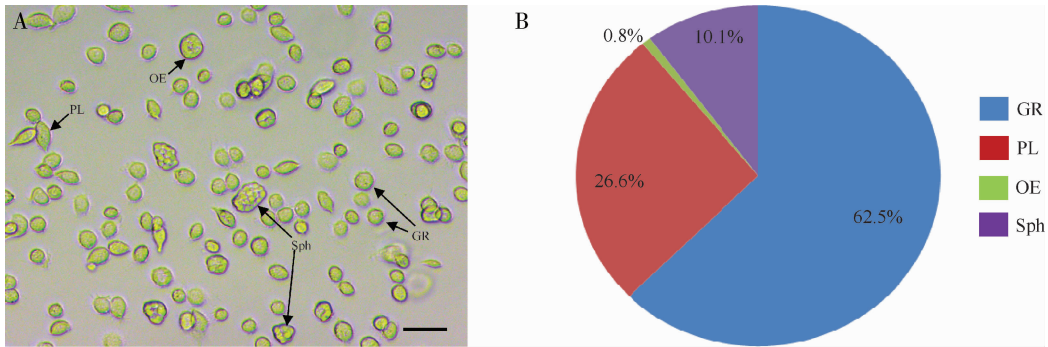


图 2 小金蝠蛾 7 龄幼虫各类血细胞的分布情况 (A) 及所占比例 (B)

Fig. 2 Distribution (A) and proportions (B) of various hemocytes in the 7th instar larvae of *Thitarodes xiaojinensis*
GR: 粒细胞 Granulocytes; PL: 浆细胞 Plasmotocytes; OE: 类绦色细胞 Oenocytoids; Sph: 珠血细胞 Spherule cells. 标尺 Scale bar = 20 μm .

发生吞噬作用。体外共孵育 24 min 时有少量酿酒酵母已被血细胞吞噬,可观察到血细胞伸出丝状伪足捕获酿酒酵母(图 3: A);34 min 时可观察到酿酒酵母被血细胞丝状伪足拉拽至细胞膜边缘(图 3: B);44 min 时可观察到酿酒酵母被完全吞噬进入血细胞细胞质中(图 3: C),整个吞噬过程持续大约 20 min。

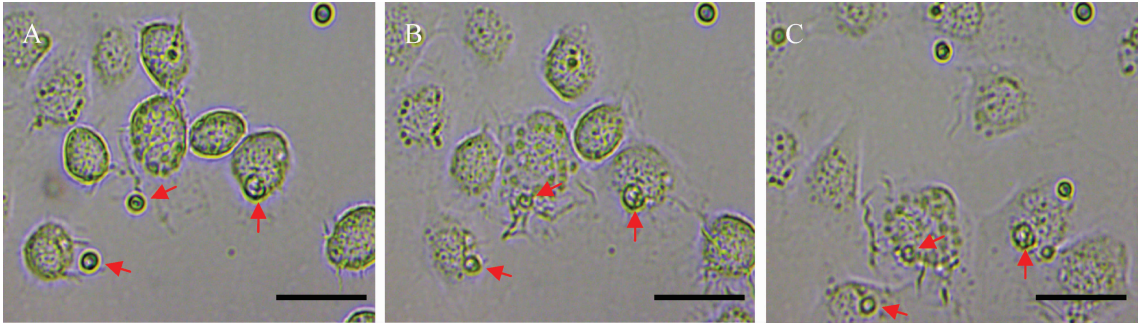


图3 小金蝠蛾7龄幼虫血细胞与酿酒酵母体外共孵育时同一视野下观察到的血细胞吞噬反应过程
Fig. 3 Phagocytosis process of hemocytes of the 7th instar larvae of *Thitarodes xiaojinensis* co-incubated with *Saccharomyces cerevisiae* *in vitro* observed under the same microscopic visual field

A: 共孵育24 min后,可以观察到血细胞伸出丝状伪足捕获酿酒酵母 After 24 min co-incubation, it can be observed that *S. cerevisiae* cells were captured by the filopodia of hemocytes; B: 共孵育34 min后,可以观察到酿酒酵母被拉拽至血细胞边缘 After 34 min co-incubation, it can be observed that *S. cerevisiae* cells were dragged to the edge of the hemocytes; C: 共孵育44 min后,可以观察到酿酒酵母被血细胞完全吞噬 After 44 min co-incubation, it can be observed that *S. cerevisiae* cells were completely phagocytized by the hemocytes. 红色箭头表示为酿酒酵母。 *S. cerevisiae* cells are pointed out by red arrows. 标尺 Scale bars = 20 μm.

2.4 小金蝠蛾幼虫血细胞的细胞免疫形成结节功能

向小金蝠蛾7龄幼虫微量注射酿酒酵母1 h后,观察到酿酒酵母可诱导小金蝠蛾幼虫血细胞发生结节反应,大量浆细胞与粒细胞多层次包被数个酿酒酵母,且包被中的酿酒酵母发生黑化现象(图4),此时有较多结节游离于血淋巴中。向小金蝠蛾微量注射酿酒酵母12 h后,可以观察到大量黑化的结节附着在脂肪体上(图5: A),在血淋巴中已观察不到游离结节,并且血淋巴中血细胞数量稀少,甚至

观察不到血细胞。取脂肪体上的黑色结节,用尖头镊子夹碎,并于正置光学相差显微镜下观察(图5: B),发现黑化的结节中有较多聚集在一起被黑化的酿酒酵母。

2.5 小金蝠蛾幼虫血细胞的细胞免疫形成包囊功能

将 Congo Red-DEAE-Sephadex A-25 凝胶珠注入小金蝠蛾7龄幼虫体内,分别在注射1 h和12 h后解剖虫体,观察血细胞对凝胶珠的细胞免疫反应。注射 Congo Red-DEAE-Sephadex A-25 凝胶珠1 h后,大量血细胞粘附在其表面(图6: A),注射 Congo Red-DEAE-Sephadex A-25 凝胶珠12 h后,随着更多血细胞不断一层层地包被, Congo Red-DEAE-Sephadex A-25 凝胶珠最终被多层血细胞包被,形成包囊(图6: B),并且包囊内的 Congo Red-DEAE-Sephadex A-25 已完全被黑化,包囊的多层血细胞包被呈现面纱状(veil-like)。该结果表明,小金蝠蛾细胞免疫针对大型外源物可以发生包囊反应。

3 讨论

本研究通过形态学观察,对小金蝠蛾7龄幼虫血细胞进行了分类与鉴定,并统计了各类血细胞所占比例。分别利用酿酒酵母与 Congo Red-DEAE-Sephadex A-25,体外和体内刺激小金蝠蛾幼虫血细胞,以此检测其细胞免疫功能是否完善。

小金蝠蛾各类血细胞形态学界限清晰,容易识别与鉴定,其中粒细胞为球形或卵圆形,可延展成片状伪足和丝状伪足,但延展后整体细胞仍为球形或

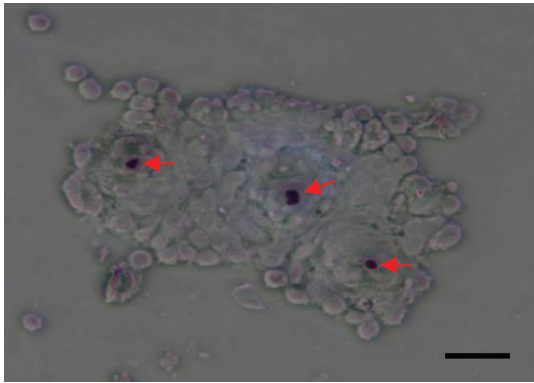


图4 酿酒酵母刺激1 h后小金蝠蛾7龄幼虫发生血细胞结节

Fig. 4 Nodulation of hemocytes of the 7th instar larvae of *Thitarodes xiaojinensis* 1 h post stimulation by *Saccharomyces cerevisiae*

酿酒酵母刺激1 h后,可以观察到酿酒酵母被多层血细胞包被,并形成一个结节。红色箭头表示为已经黑化的酿酒酵母。 Being stimulated by *S. cerevisiae* for 1 h, *S. cerevisiae* cells were enveloped by multilayered hemocytes, and nodulations were formed. Melanized *S. cerevisiae* cells are pointed out by red arrows. 标尺 Scale bar = 40 μm.

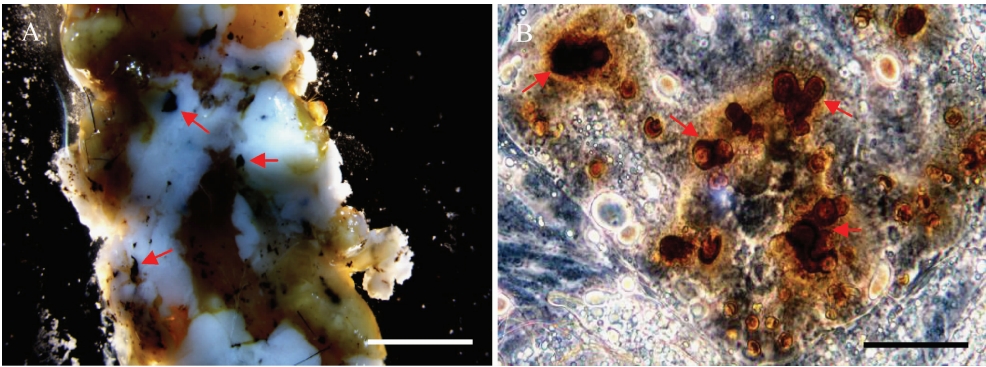


图5 酿酒酵母刺激 12 h 后小金蝠蛾 7 龄幼虫脂肪体上结节(A)和结节中的酿酒酵母(B)

Fig. 5 Nodulations on fat body of the 7th instar larvae of *Thitarodes xiaojinensis* 12 h post stimulation by *Saccharomyces cerevisiae* (A) and *S. cerevisiae* in nodulations (B)

A: 酿酒酵母刺激 12 h 后,大量黑化的结节附着于脂肪体上。红色箭头表示为脂肪体上黑化的结节。After being stimulated by *S. cerevisiae* for 12 h, a large number of melanized nodulations attached to the fat body. Melanized nodulations attached to the fat body are pointed out by red arrows. 标尺 Scale bar =2 mm. B: 在黑化的结节中,可以观察到大量黑化的酿酒酵母。红色箭头表示为已经黑化的酿酒酵母。A lot of melanized *S. cerevisiae* cells in melanized nodulation can be observed. Melanized *S. cerevisiae* cells are pointed out by red arrows. 标尺 Scale bar =20 μm.

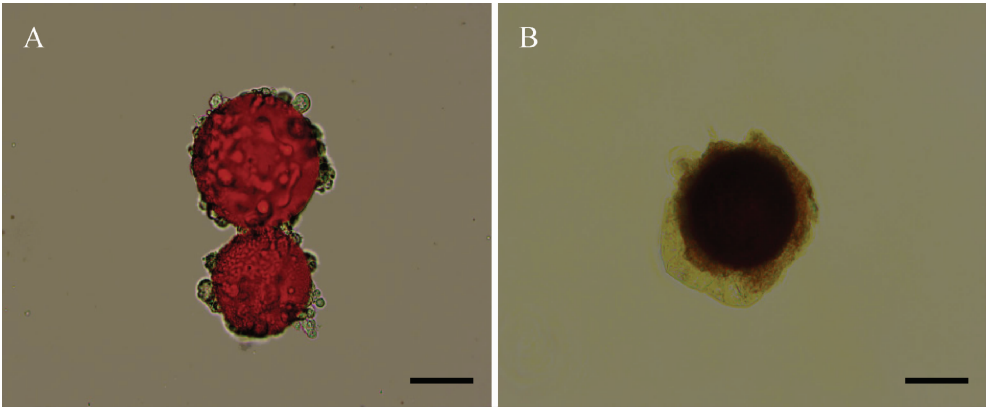


图6 小金蝠蛾 7 龄幼虫血细胞对 Congo Red-DEAE-Sephadex A-25 凝胶珠的包裹反应

Fig. 6 Encapsulation of hemocytes in the 7th instar larvae of *Thitarodes xiaojinensis* after being stimulated by Congo Red stained DEAE-Sephadex A-25

A: Congo Red-DEAE-Sephadex A-25 凝胶珠刺激 1 h 后,大量血细胞附着于 Congo Red-DEAE-Sephadex A-25 凝胶珠上。After being stimulated by Congo Red stained DEAE-Sephadex A-25 for 1 h, a large number of hemocytes attached to the Congo Red-DEAE-Sephadex A-25. 标尺 Scale bar = 40 μm. B: Congo Red-DEAE-Sephadex A-25 凝胶珠刺激 12 h 后,Congo Red-DEAE-Sephadex A-25 已完全黑化,包裹的多层血细胞包被呈现面纱状。After being stimulated by Congo Red stained DEAE-Sephadex A-25 for 12 h, Congo Red stained DEAE-Sephadex A-25 has been completely melanized, and the envelopes of encapsulation formed by hemocytes present veil-like shape. 标尺 Scale bar =40 μm.

卵圆形,并存在黑色颗粒内含物;浆细胞为球形、卵圆形或梭形,可延展成片状伪足和丝状伪足,延展后为纺锤形或不规则形状,并也存在黑色颗粒内含物;类绦色细胞体积最大,不可延展,细胞质于光学相差显微镜下混沌均一,体外容易破裂溶胞并向血淋巴释放内含物;珠血细胞成不规则形状,胞质中充满内含物小球。该观察结果基本符合 Lavine 和 Strand (2002) 对鳞翅目昆虫血细胞的分类和描述。血细胞在孔板孵育初期,浆细胞与粒细胞从形态学上难以识别与鉴定,需孵育 1 h 以上,待浆细胞与粒细胞

爬片延展后方容易识别与鉴定。本研究并未鉴定出已报道典型的原血细胞,可能是由于原血细胞具有干细胞功能,在血淋巴中含量极低,对原血细胞的识别与鉴定仍需进一步探索。

小金蝠蛾的血淋巴中所占比例最高的是粒细胞,其所占比例高达 62.5%,高于其他已报道鳞翅目昆虫粒细胞所占比例的平均水平。推测粒细胞在小金蝠蛾的细胞免疫中起主要作用。由于蝠蛾是鳞翅目昆虫中进化上最原始的种系(Nielsen *et al.*, 2000),推测粒细胞在鳞翅目昆虫细胞免疫系统中

可能是最早出现,并对外源物具有防御与清除作用的主要血细胞类型。

小金蝠蛾细胞免疫功能完善,在酿酒酵母的刺激下,可正常发生吞噬与结节。在吞噬过程(图3)中,小金蝠蛾幼虫血细胞首先延伸出丝状伪足捕获酿酒酵母,将酿酒酵母拉拽至细胞膜边缘将其吞噬,说明小金蝠蛾幼虫血细胞丝状伪足的形成,对细胞免疫吞噬功能十分重要。在结节形成过程中,小金蝠蛾幼虫血细胞受到酵母刺激后,初期(1 h 左右)能够形成较多的可游离于血淋巴中的结节,12 h 后结节附着于脂肪体上,此时血淋巴中观察不到游离的结节,同时血淋巴中的血细胞也大幅减少,推测大部分血细胞被消耗,用于大量结节的形成并被脂肪体捕获。进一步暗示,在小金蝠蛾的细胞免疫中,脂肪体参与了结节反应。在 Congo Red-DEAE-Sephadex A-25 的刺激下,小金蝠蛾幼虫血细胞对大型外源物可正常发生包囊反应。由于体外实验的限制,难以捕获结节与包囊形成的动态现象,对于细胞免疫功能结节与包囊中,血细胞的作用顺序与机制尚不明确,仍需进一步探索。

综上所述,本研究通过形态学手段鉴定了小金蝠蛾幼虫血细胞种类,并对各类血细胞进行了所占比例统计,初步检测了小金蝠蛾细胞免疫功能,表明小金蝠蛾幼虫血细胞可以正常发生吞噬、结节以及包囊3种细胞免疫反应,细胞免疫功能完善,为后续研究小金蝠蛾与冬虫夏草菌的免疫互作奠定了基础。

参考文献 (References)

Ashida M, Dohke K, 1980. Activation of pro-phenoloxidase by the activating enzyme of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem.*, 10(1): 37–47.

Blanco LLA, Crispim JS, Fernandes KM, Oliveira LL, Pereira MF, Bazzolli DMS, Martins GF, 2017. Differential cellular immune response of *Galleria mellonella* to *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Cell Tissue Res.*, 370(1): 153–168.

Bogdan C, Rollinghoff M, Diefenbach A, 2000. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr. Opin. Immunol.*, 12(1): 64–76.

Butt TM, Shields KS, 1996. The structure and behavior of gypsy moth (*Lymantria dispar*) hemocytes. *J. Invertebr. Pathol.*, 68(1): 1–14.

Cerenius L, Soderhal K, 2004. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunol. Rev.*, 198(1): 116–126.

Dubovskiy IM, Kryukova NA, Glupov VV, Ratcliffe NA, 2016. Encapsulation and nodulation in insects. *Invertebr. Surv. J.*, 13: 229–246.

Gardiner EMM, Strand MR, 2000. Hematopoiesis in larval *Pseudoplusia includens* and *Spodoptera frugiperda*. *Arch. Insect Biochem.*, 43(4): 147–164.

Gillespie JP, Kanost MR, Trenczek T, 1997. Biological mediators of insect immunity. *Annu. Rev. Entomol.*, 42: 611–643.

Hu X, Zhang YJ, Xiao GH, Zheng P, Xia YL, Zhang XY, St. Leger RJ, Liu XZ, Wang CS, 2013. Genome survey uncovers the secrets of sex and lifestyle in caterpillar fungus. *Chin. Sci. Bull.*, 58(23): 2846–2854.

Iwama R, Ashida M, 1986. Biosynthesis of prophenoloxidase in hemocytes of larval hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem.*, 16(3): 547–555.

Kamaladevi A, Marudhupandian S, Balamurugan K, 2017. Model system based proteomics to understand the host response during bacterial infections. *Mol. BioSyst.*, 13(12): 2489–2497.

Lackie AM, 1988. Immune-mechanisms in insects. *Parasitol. Today*, 4(4): 98–105.

Lanot R, Zachary D, Holder F, Meister M, 2001. Postembryonic hematopoiesis in *Drosophila*. *Dev. Biol.*, 230(2): 243–257.

Lavine MD, Strand MR, 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochem Molec. Biol.*, 32(10): 1295–1309.

Lowenberger C, 2001. Innate immune response of *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 31(3): 219–229.

Majumder J, Ghosh D, Agarwala BK, 2017. Haemocyte morphology and differential haemocyte counts of giant ladybird beetle, *Anisolemnia dilatata* (F.) (Coleoptera: Coccinellidae): a unique predator of bombo woolly aphids. *Curr. Sci.*, 112(1): 160–164.

Ng TB, Wang HX, 2005. Pharmacological actions of *Cordyceps*, a prized folk medicine. *J. Pharm. Pharmacol.*, 57(12): 1509–1519.

Nielsen ES, Robinson GS, Wagner DL, 2000. Ghost-moths of the world: a global inventory and bibliography of the *Exoporia* (Mnesarchaeoidea and Hepialoidea) (Lepidoptera). *J. Nat. Hist.*, 34(6): 823–878.

Sass M, Kiss A, Locke M, 1994. Integument and hemocyte peptides. *J. Insect Physiol.*, 40(5): 407–421.

Schmidt O, Theopold U, Strand M, 2001. Innate immunity and its evasion and suppression by hymenopteran endoparasitoids. *BioEssays*, 23(4): 344–351.

Strand MR, Pech LL, 1995. Immunological basis for compatibility in parasitoid host relationships. *Annu. Rev. Entomol.*, 40: 31–56.

Zhou X, Gong Z, Su Y, Lin J, Tank K, 2009. Cordyceps fungi: natural products, pharmacological functions and developmental products. *J. Pharm. Pharmacol.*, 61(3): 279–291.

(责任编辑:赵利辉)